



Chromatographie I

WS 2022/23 R. Vasold

Chromatographie I

HPLC

Vorlesung



R. Vasold

Analytik - Abteilung

Institut für Organische Chemie

Prof. B. König

Kapitel I: Einführung

Kapitel II: Grundprinzipien

Kapitel III: Der chromatographische Prozeß

Kapitel IV: Das Chromatogramm

Kapitel V: Literatur



Kapitel I: Einführung



High
Performance-**P**ressure
Liquid
Chromatography

(= Hochleistungs/Druck
-Flüssig-Chromatographie)



Unterschied zwischen **moderner HPLC** und klassischer **Säulen-Chromatographie** ?



wesentlich **höhere Auflösung** bei Trennung
(Trennung von bis zu 100 Komponenten/Lauf u. mehr)



Drastische **Verkürzung der Analysendauer**
(h → Bereich von Minuten)



Erhebliche Verbesserung der **Empfindlichkeit**
(ca. 10^{-9} g [ng] bis 10^{-12} g [pg])



★ Notwendige **Voraussetzung** ist die **Löslichkeit** der zu analysierenden Substanz in einem geeignetem Solvens

★ Die **HPLC** wird eingesetzt, wenn:

- ➔ Substanzen **schwer flüchtig** oder **nicht flüchtig** sind (sonst alternativ Einsatz von GC)
- ➔ Substanzen mit rel. **hohem Molekulargewicht** vorliegen (MW > 500)
- ➔ es sich um **thermisch instabile** (leicht zersetzliche) Substanzen handelt.



- ➔ Zur **Reinheits- und Produktkontrolle** chem. Substanzen
- ➔ Zur **Analyse** von **Arzneistoffen**
- ➔ Zur **Bestimmung** von **Wirkstoffen** in **biolog. Matrices**
- ➔ Zur **Bestimmung** von **Schadstoffen** (Umweltanalytik)
- ➔ Zur **Trennung** und **Reinigung** von **Biopolymeren** (Enzymen, Nukleinsäuren, Peptiden ...)
- ➔ **Standardmethode** in fast allen **chem. Laboratorien**

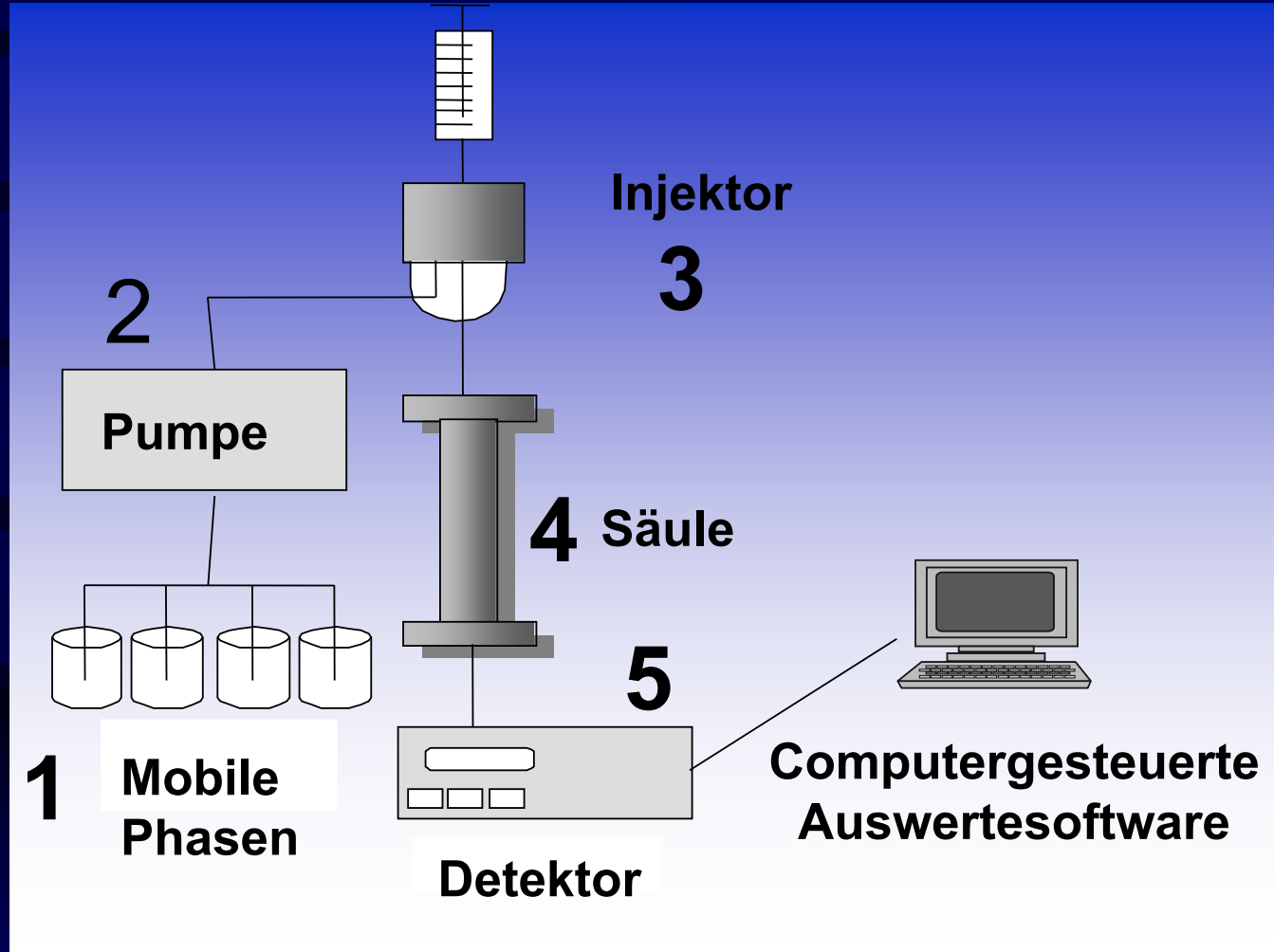


Abb. 1: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage



Abb. 2: Moderner HPLC-Arbeitsplatz



Chromatographie I
WS 2022/23 R. Vasold



Kapitel II: Grundprinzipien



II Grundprinzipien

II.1 Grundbegriff: **Chromatographie**



Abb. 3: Durchführen einer Säulenchromatographie



II Grundprinzipien

II.1 Grundbegriff: **Chromatographie**

Historie: M. Tswett (1906)

Der Begriff „**Chromatographie**“ wurde 1906 bei der Beobachtung geprägt, als sich ein Extrakt aus grünen Blättern auf einer mit gepulvertem Zucker gefüllten Säule in verschieden gefärbte Einzelfarbstoffe (Chlorophyll, Carotin etc.) auftrennen ließ.

Chroma = Farbe / Graphiein = schreiben

Definition: **Chromatographie**

Mit dem Ausdruck „**Chromatographie**“ bezeichnet man einen **Trennprozess**, bei welchem das Probengemisch zwischen zwei **nicht miteinander mischbaren** Phasen im sog. chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Eine **Hilfsphase (stationäre Phase)** ruht dabei, während die andere **Hilfsphase (mobile Phase)** an ihr vorbei strömt.





II Grundprinzipien

II.2 Grundbegriff: **Hilfsphasen**

Stationäre Phase:

- ★ **Meist** ist in der Chromatographie die stationäre Phase **fest** (Chromatographiebett).
- ★ **Selten** ist die stationäre Phase **flüssig** (dann aber als unbeweglicher „stationärer“, flüssiger Film auf der Oberfläche eines Feststoffes aufgebracht z.B. als adsorbierter Wasserfilm auf Cellulose), oder als unbewegliche flüssige, sog. quasistationäre Phase im Inneren von porösen Kugeln (Gelpermeationschromatographie).

Mobile Phase:

Die mobile Phase kann sein:

- ★ **gasförmig** → **Gaschromatographie** **GC**
- ★ **flüssig** → **Liquidchromatographie** **LC/HPLC**

II.3 Grundbegriff: Verteilungskoeffizient K

beschreibt die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen **stationärer** Phase und **mobiler** Phase:

$$K = \frac{c_s(X)}{c_m(X)} \quad (1)$$

K = Verteilungskoeffizient

$c_s(X)$ = Stoffmengenkonzentration der Substanz X in der stationären Phase

$c_m(X)$ = Stoffmengenkonzentration der Substanz X in der mobilen Phase



II Grundprinzipien

II.4 Grundbegriff: Kapazitätsfaktor k

beschreibt die unterschiedliche Verteilung der Substanzen zwischen **stationärer** Phase und **mobiler** Phase :

$$k = \frac{n_s(X)}{n_m(X)} \quad (2)$$

k = Kapazitäts- oder Retentionsfaktor

$n_s(X)$ = Stoffmenge der Substanz X in/an der stationären Phase

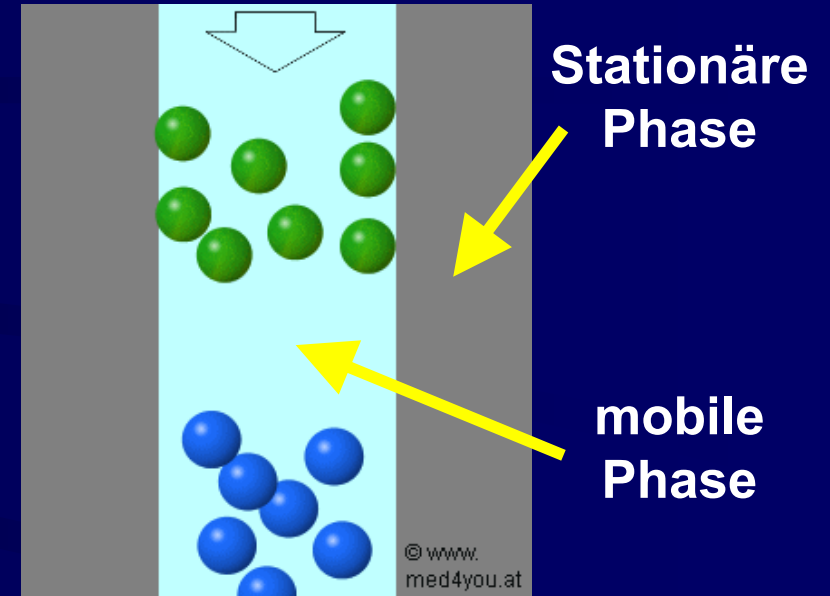
$n_m(X)$ = Stoffmenge der Substanz X in der mobilen Phase

Die **unterschiedliche Wechselwirkung** von Substanzen in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen ergibt eine Vielzahl **unterschiedlicher Chromatographiearten**:

II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

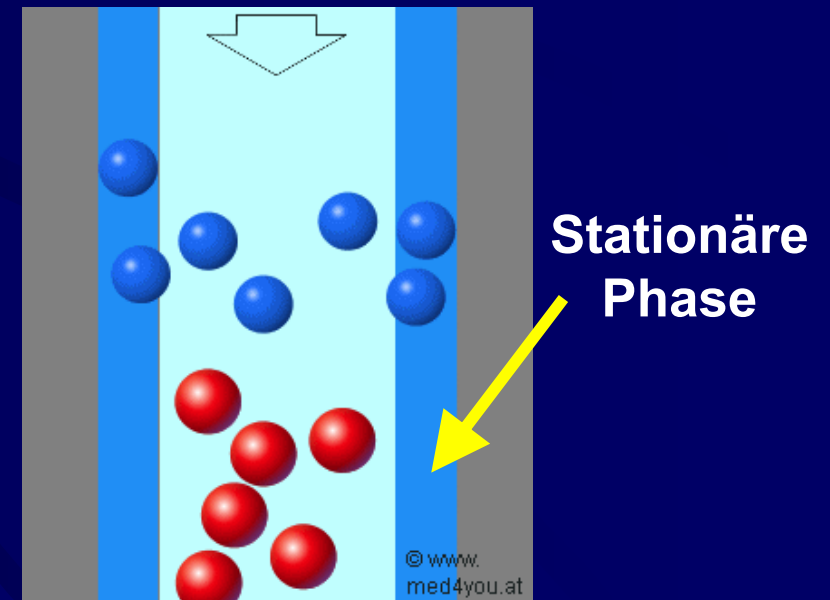
Trennung durch Adsorption

*Adsorptions-Chromatographie
flüssig / fest
(NP/RP-HPLC)*



Trennung durch Löslichkeit

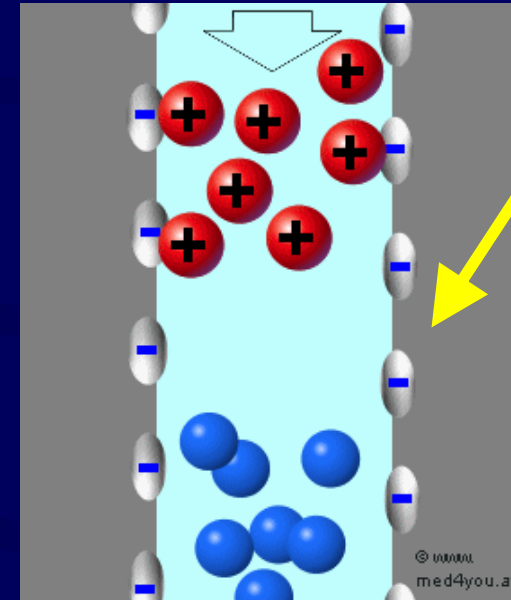
*Verteilungs-Chromatographie
flüssig / flüssig*



II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

Trennung durch Ladung
(vereinfacht)

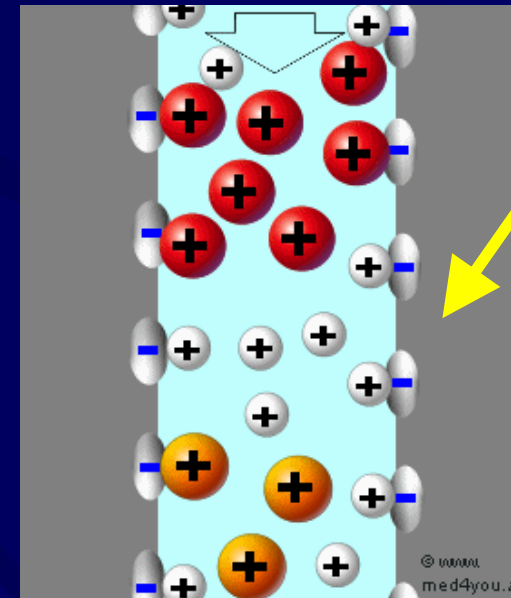
*Ionenaustausch-
Chromatographie*



Stationäre
Phase

Trennung durch Ladung
(realistisch)

*Ionenaustausch-
Chromatographie*

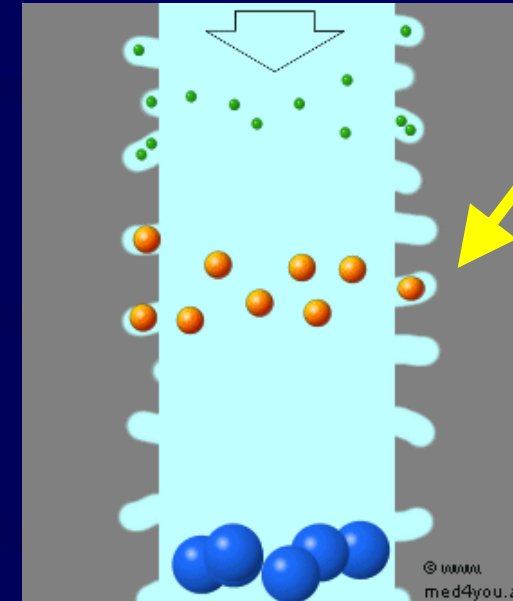


Stationäre
Phase

II.5 Chromatographiearten (Auswahl)

Trennung durch Größe/Gestalt

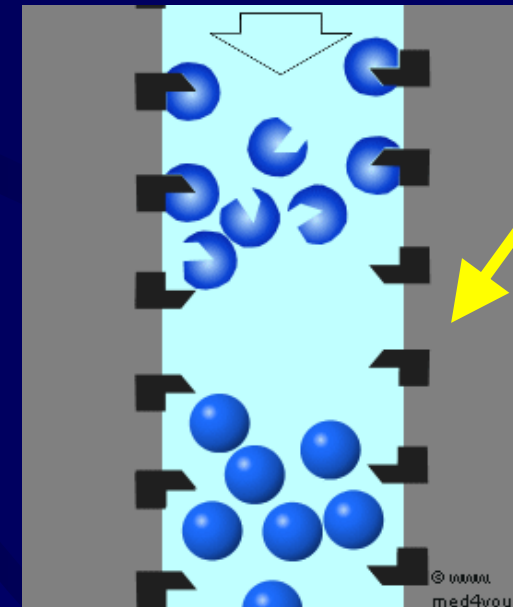
*Ausschluß-Chromatographie
SEC, GPC*



Stationäre Phase

Trennung durch Affinität

*Affinitäts-Chromatographie
z.B. Antigen/Antikörper*



Stationäre Phase



Kapitel III: Der chromatographische Prozeß

III Der chromatographische Prozeß²¹

III.1 Der Trennvorgang

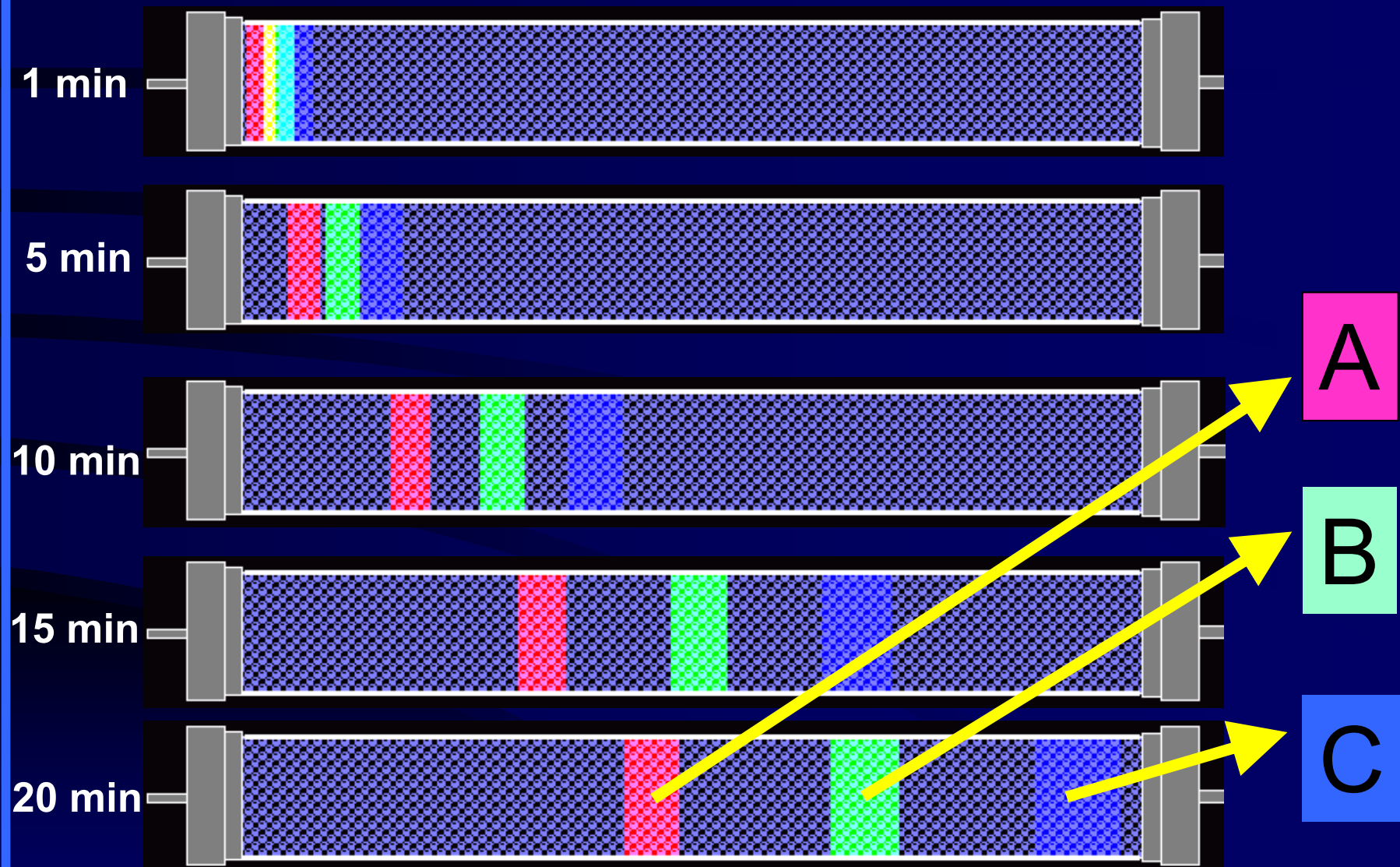


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf einer chromatographischen Trennung

III.2 Definitionen

Definition: Chromatogramm

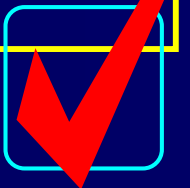
Mit dem Ausdruck „**Chromatogramm**“ bezeichnet man die graphische Auftragung der Größenwerte einer Größe (z.B. der Absorption), die am Ende der stationären Phase, also z.B. am Säulenausgang, in der mobilen Phase gemessen werden, gegen die Zeit oder das Volumen der mobilen Phase.

**Definition: Retentionsvolumen / -Zeit**

Das Volumen der mobilen Phase, das die stationäre Phase vom Moment der Probenaufnahme bis zum Erscheinen der Substanz **X** als Peak im Detektor (Chromatogramm) passiert hat, nennt man

das Retentionsvolumen der Substanz X: $V_R(X)$

Die zugehörige Zeit nennt man die Retentionszeit: $t_R(X)$.



III.3 Das Retentionsvolumen $V_R(X)$

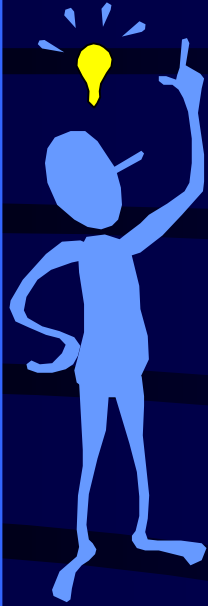
$$V_R(X) = F \cdot t_R(X) \quad (3)$$

Retentionsvolumen [ml]

Retentionszeit [min]

Volumenfließgeschwindigkeit [ml·min⁻¹]

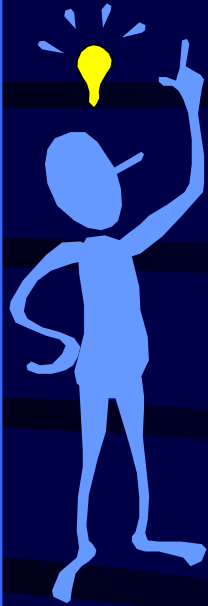
Von besonderem Interesse ist neben der **Volumenfließgeschwindigkeit** aber auch die sog. **lineare Fließgeschwindigkeit**

III.4 Die lineare Fließgeschwindigkeit u 

Die **lineare** Wanderungsgeschwindigkeit $u(X)$ der Substanz **X** muß der **linearen** Wanderungs-(Fließ)-Geschwindigkeit der mobilen Phase u_m direkt proportional sein.

d.h. $u(X)$ wird immer kleiner u_m oder höchstens gleich u_m sein.

$$u(X) \propto u_m \quad \text{und} \quad u(X) \leq u_m \quad (4)$$

III.5.1 Der Proportionalitätsfaktor $\chi_m(X)$ 

Der Proportionalitätsfaktor $\chi_m(X)$ muß also zwischen **0** und **1** liegen.

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m \quad (5)$$

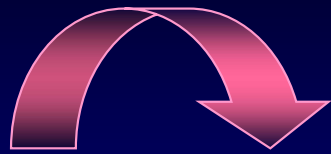
Es kann sich bei $\chi_m(X)$ nur um den Stoffmengenanteil der Substanz **X** in der mobilen Phase handeln, weil ja die Substanz **X** nur dann überhaupt mit der Geschwindigkeit u_m transportiert werden kann.

Dieser Stoffmengenanteil ist wie folgt definiert:

III.6 Zusammenhang $\chi_m(X)$ und k

$$\chi_m(X) = \frac{n_m(X)}{n_s(X) + n_m(X)} = \frac{1}{\frac{n_s(X)}{n_m(X)} + 1} = \frac{1}{k + 1} \quad (6)$$

$$u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m = \frac{1}{k + 1} u_m \quad (7)$$



$$\frac{u_m}{u(X)} = k + 1 \quad (8)$$

k = Retentions-/Kapazitätsfaktor

III.6.1 Grenzfälle

siehe (5) $u(X) = \chi_m(X) \cdot u_m$

Da für jeden Stoffmengenanteil gilt: $0 \leq \chi_m(X) \leq 1$

Erhält man zwei Grenzfälle:

1.) Für $\chi_m(X) = 0 \longrightarrow u(X) = 0$

d.h. es befindet sich **keine** Substanz **X** in der mobilen Phase - **alles** ist an die **stationäre** Phase gebunden, d.h. **keine Wanderung** der Substanz

2.) Für $\chi_m(X) = 1 \longrightarrow u(X) = u_m$

d.h. es befindet sich die **gesamte** Substanz **X** in der **mobilen** Phase – die Substanz **X** hat somit keine Wechselwirkung mit der stationäre Phase, d.h. **Wanderungsgeschwindigkeit** von **X** gleich der der **mobilen Phase**.

III.7 Die Totzeit t_0 bzw. Durchbruchzeit t_m

Die Zeit zwischen dem Aufbringen der Substanz **X** auf die Säule und dem Auftauchen der Substanz **X** im Detektor, die im **2. Fall** verstreicht, wenn also **keine Wechselwirkung** der Substanz **X** mit der stationären Phase stattfindet, bezeichnet man häufig als sog. „**Totzeit t_0 oder Durchbruchzeit t_m** “ der Säule.

Analog dazu wird das zugehörige Volumen als sog. „**Totvolumen V_0 oder Durchbruchsvolumen V_m** “ der Säule bezeichnet.

von der **IUPAC** empfohlen:

Durchbruchsvolumen bzw. Durchbruchszeit

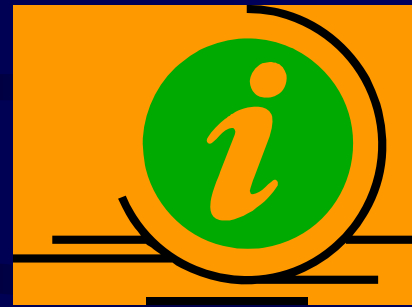
V_m und t_m

III.8.1 Durchbruchsvolumen V_m und -zeit t_m **Definition: Durchbruchsvolumen / -zeit**

Als **Durchbruchsvolumen V_m** bzw. **-zeit t_m** wird dasjenige **Volumen** (bzw. die dazu **korrespondierende Zeit**) bezeichnet, das benötigt wird, um eine **nicht-retardierende** Substanz von der **Injektionsstelle** bis zur **Detektionsstelle** zu befördern. Dieses Volumen umfaßt also genau genommen zusätzlich zum **Volumen der mobilen Phase im Säulenbett V_{mob}** die „**Totvolumina**“ des **Gerätes** z.B. im Einspritzventil, in den Verbindungskapillaren, im Detektor etc..

t_m Ist für alle Substanzen während einer chromatographischen Analyse **gleich**.

Die Auftrennung unterschiedlicher Substanzen kommt ausschließlich dadurch zustande, daß sich diese auf Grund ihrer chemischen Beschaffenheit zusätzlich **unterschiedlich lange** in der **stationären Phase** aufhalten und somit zu unterschiedlichen **Retentionszeiten** eluieren, d.h. getrennt werden .



Anmerkung !

Da bei modernen HPLC-Anlagen diese **eigentlichen „Totvolumina des apparativen Systems“** auf ein **Minimum** reduziert sind (durch minimale Kapillardurchmesser, optimierte Gerätegeometrie etc.), können diese Parameter zur **Vereinfachung der Problematik** hier **vernachlässigt** werden, und es wird im Folgenden davon ausgegangen, daß t_m ausschließlich von der **Säulenlänge** beeinflusst wird, und sich die **Wanderungsgeschwindigkeiten $u(x)$** um u_m bei konstanter Flußrate auf die **Säulenlänge** beziehen.

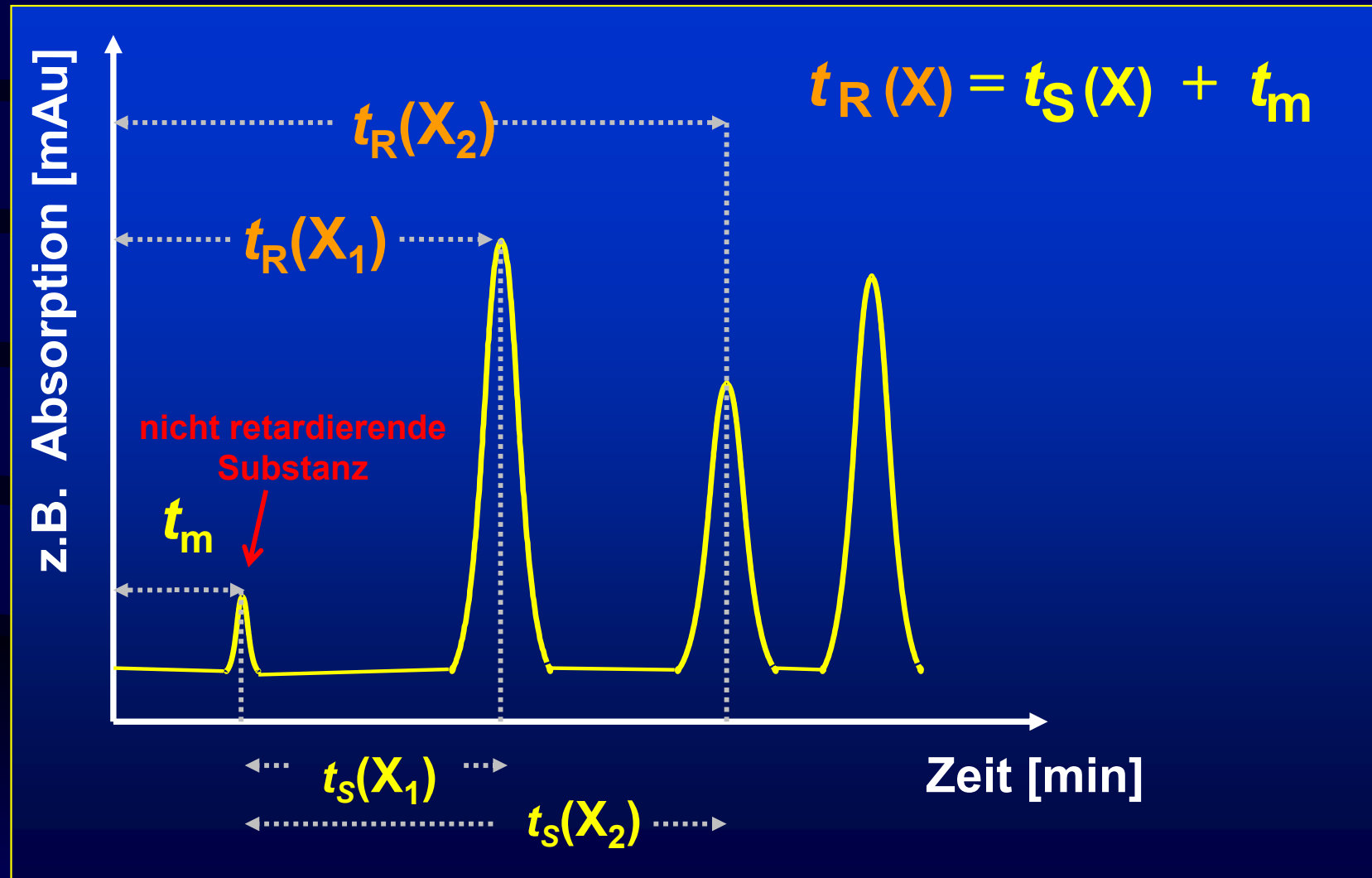
III.8.2 Zusammenhang t_m , $t_R(X)$ und t_S 

Abb. 5: Musterchromatogramm mit $t_S(X)$ als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase

III.8.3 Bestimmung von t_m und $t_R(X)$ 

Wovon sind **Durchbruchzeit** t_m und **Retentionszeit** $t_R(X)$ abhängig ?

- ★ z.B. von den Abmessungen der Säule (**Länge: L**)
- ★ z.B. von den Wanderungsgeschwindigkeiten u_m , $u(X)$

Durchbruchsvolumen

$$t_m = \frac{L}{u_m} = \frac{V_m}{F}$$

(9)

Retentionsvolumen

$$t_R(X) = \frac{L}{u(x)} = \frac{V_R(X)}{F}$$

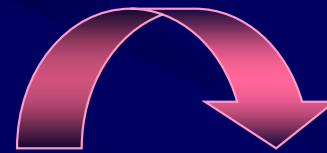
(10)

III.8.4 Zusammenhang t_m , $t_R(X)$ und k

$$\frac{t_R(X)}{t_m} = \frac{V_R(X)}{V_m} = \frac{u_m}{u(X)} \quad (11)$$

berücksichtigt man
die bekannte Beziehung

$$(8) \quad \frac{u_m}{u(X)} = k + 1$$



ergibt sich:

III.8.4 Zusammenhang t_m , $t_R(X)$ und k

$$\frac{t_R(X)}{t_m} = k + 1 \quad (12)$$

Auflösen von Gleichung (17) nach k dem Kapazitäts- oder Retentionsfaktor liefert:

$$k = \frac{t_R(X)}{t_m} - 1 \quad (13)$$

III.9.1 Bedeutung des Kapazitätsfaktors k

$$(13) \quad k = \frac{t_R(X)}{t_m} - 1$$

Definition: Kapazitäts-(Retentions)faktor

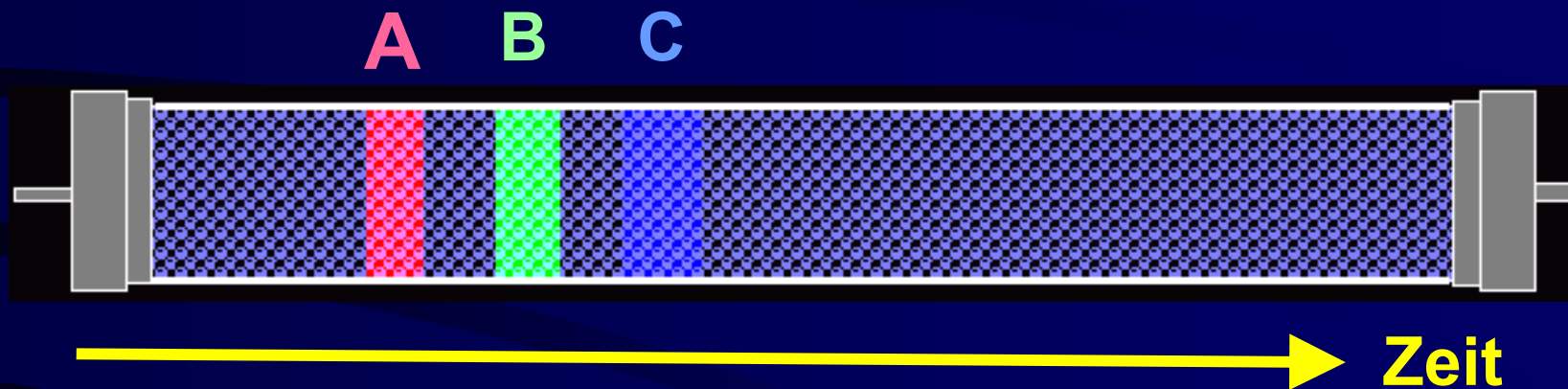
Um „**Chromatogramme**“, die z.B. an verschiedenen langen oder unterschiedlich dicken Säulen oder bei unterschiedlicher Flußgeschwindigkeit gemessen wurden, vergleichen zu können, bedient man sich einer dimensionslosen Größe, dem **Kapazitäts-(Retentions)faktor k** .

Der **Kapazitäts-(Retentions)faktor k** einer Substanz **X** ist eine auf die Durchbruchzeit „normierte Elutionsgröße“.



III.10 Die **Theorie der Böden**

Es gibt mehrere Möglichkeiten, den chromatographischen Trennprozess genauer zu beschreiben.

**Ziel:**

Die Position **jeder einzelnen Komponente** im chromatographischen Trennsystem und ihre dortige **Konzentrationsverteilung** in Abhängigkeit von der **Zeit** bestimmt zu können.

III.10 Die **Theorie der Böden**

Ein möglicher Ansatz:



Theorie der Böden
(theoretisches Trennstufenmodell)



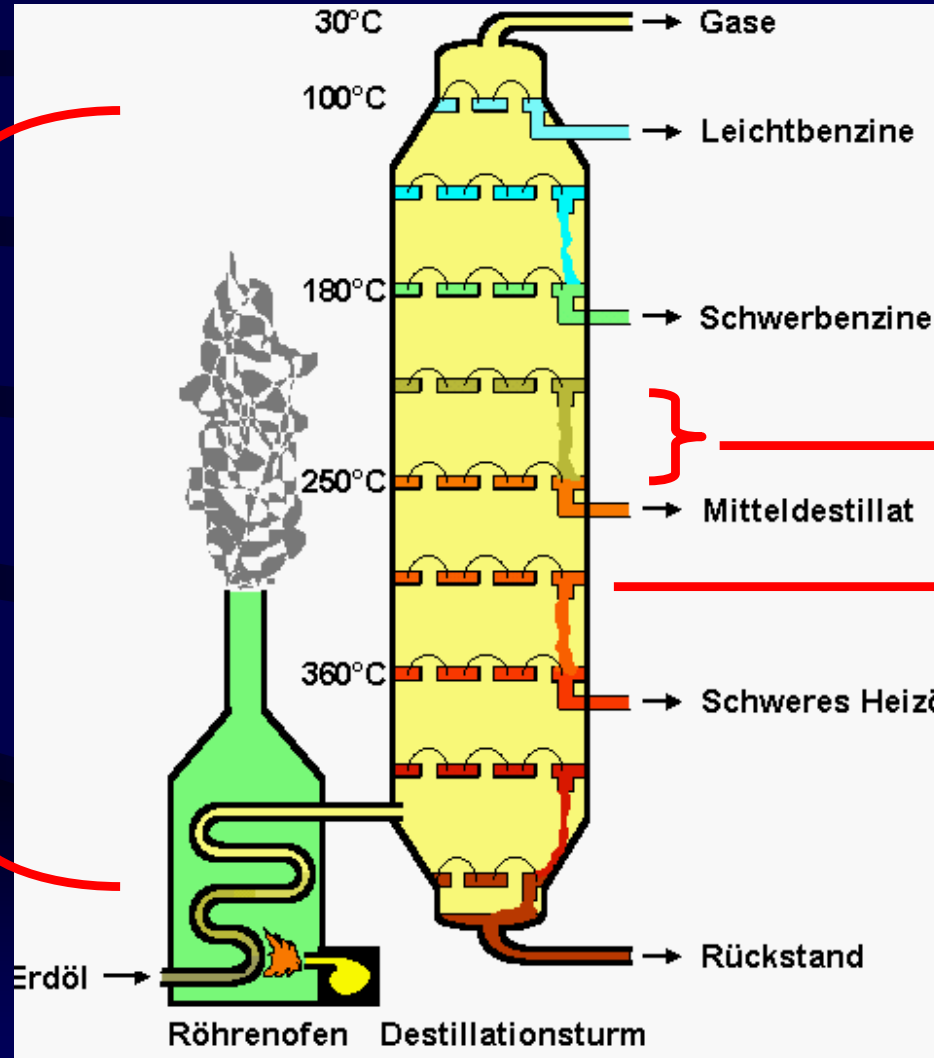
Übertragung der **Theorie der fraktionierten Destillation** auf die Säulenchromatographie



Übernimmt Begriffe von **Bodenhöhe** und **Bodenzahl**

Anschaulich, aber natürlich nur **näherungsweise** richtig, da die Annahme einer **wiederholten Einstellung separater Gleichgewichte** beim Vorliegen einer **bewegten mobilen Phase** eher unrealistisch ist

III.10 Die Theorie der Böden



Bodenzahl

Bodenhöhe

Boden

Abb. 6: Beispiel eines Destillationsturms

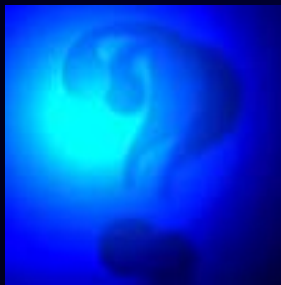
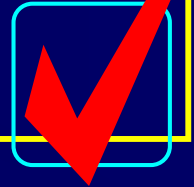
III.10.1 Trennstufenhöhe und Trennstufenzahl

Bodenhöhe = Trennstufenhöhe H

Bodenzahl = Trennstufenzahl N_z

Definition: Trennstufenhöhe

Die Trennstufenhöhe H (die Höhe eines Theoretischen Bodens), oder **HETP (height equivalent to one theoretical plate)** ist die **Strecke**, auf der sich beim Fließen der mobilen Phase das Gleichgewicht **einmal** einstellt.



Wie hängen Trennstufenhöhe H und Trennstufenzahl N_z in der Chromatographie voneinander ab ?

III.10.1.1 Beeinflussung von H und N_z

Trennstufenhöhe und **Trennstufenzahl** hängen wie folgt voneinander ab:

Länge der Säule

$$H = \frac{L}{N_z}$$

(14)



$$N_z = \frac{L}{H}$$

(15)

$$H = \frac{L}{N} = 1000 \times \frac{L}{8} \times \ln 2 \left[\frac{W_{(0,5)}}{t_R} \right]^2$$

III.10.1.2 Bedeutung von H und N_z

Bedeutung:



N_z charakterisiert somit die **Leistungsfähigkeit** einer Trennsäule. Je besser die Säule gepackt wurde (kleine Trennstufenhöhe), und je länger sie ist, desto größer ist die **Trennstufenzahl** und somit die **Trennleistung**.

III.10.1.3 Einfluß von u_m auf H und N_z 

Gegeben sind z.B.:

- ★ Dimensionen d. Säule: (Länge, Dicke)
- ★ Füllung d. Säule (Material, Porenweite Partikelgröße etc.)

Für den Experimentator einzig **variierbar** soll sein:
Fluß, bzw. die Fließgeschwindigkeit u_m der mobilen Phase durch die Säule.



bei **drastischer** Erhöhung des Flusses kann sich das **Gleichgewicht weniger oft** einstellen -> **Trennung schlechter**

bei **drastischer** Erniedrigung des Flusses kommen immer mehr **Diffusionsvorgänge** ins Spiel -> **Trennung schlechter**

III.10.1.4 Das H/u-Diagramm

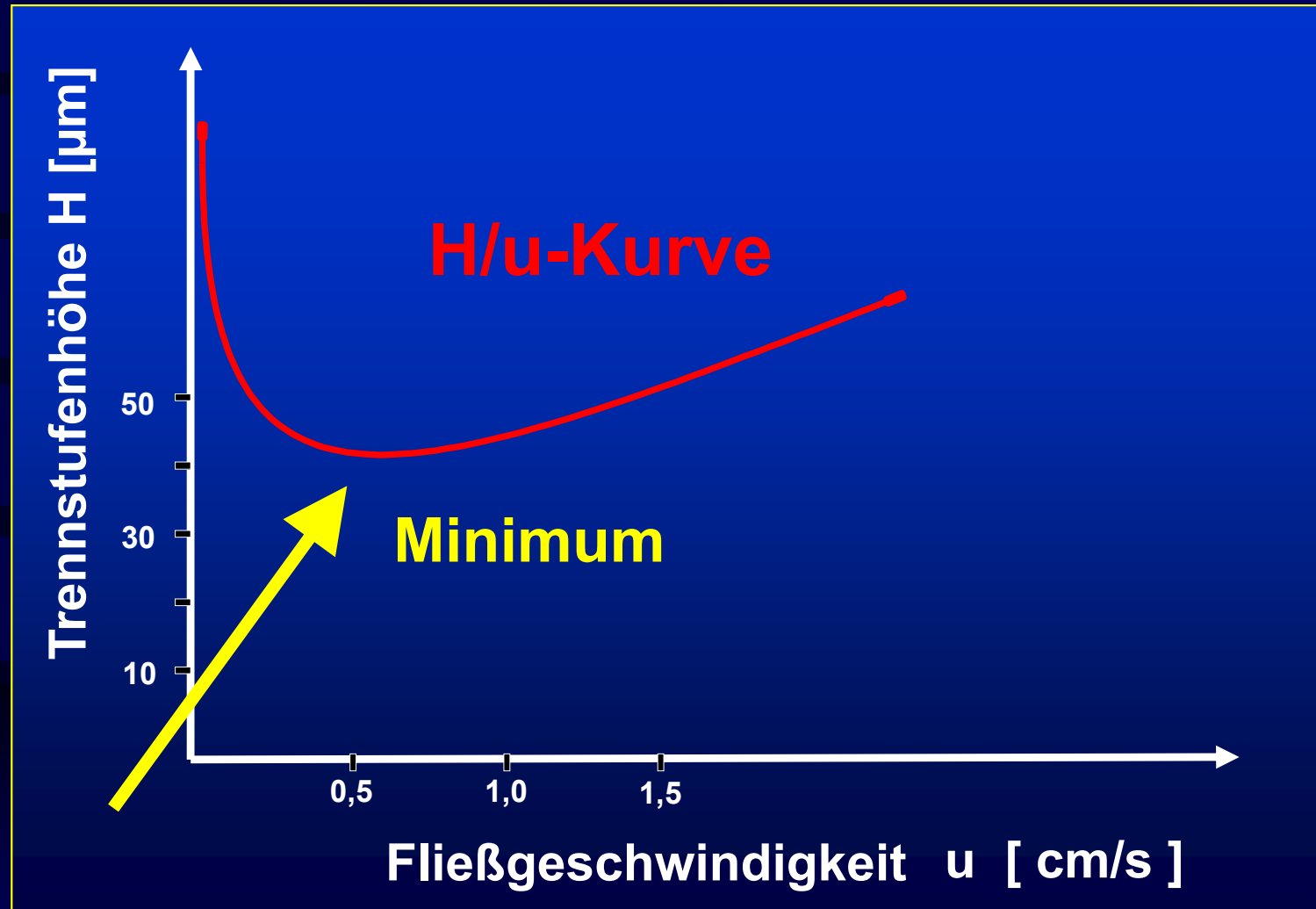


Abb. 7: H/u-Diagramm zur Bestimmung des optimalen Flusses

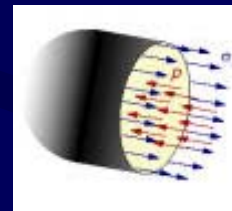
III.11 Die **van Deemter-Gleichung**

Hierbei handelt es sich um eine **empirische** Gleichung mit folgenden Größen:

$$H = A + \frac{B}{u_m} + C \cdot u_m \quad (16)$$



**Eddy-Diffusion
(Wirbeldiffusion)**
A-Term



**Longitudinal-
Diffusion**
B-Term



**Stoffaustausch
-Anteil**
C-Term

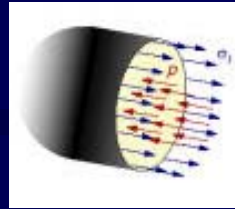
III.11 Die **van Deemter-Gleichung**

Eddy-Diffusion
(Wirbeldiffusion)

A-Term

➔ beschreibt die **Bandenverbreiterung**, die von der **Geometrie** der **Festphasenteilchen** und von der **Packung** dieser Teilchen in der Säule herrührt.

➔ **Statistisch** gesehen haben einige Probenmoleküle einen relativ **kurzen** Weg, während andere gezwungen sind, einen „**Umweg**“ zu machen.

III.11 Die **van Deemter-Gleichung**

Longitudinal-
Diffusion

B-Term

- ➔ berücksichtigt: **Strömungsverteilung !**
Laminare Strömung (Molekültransport) ist in der **Mitte** zwischen zwei Partikeln **größer** als in der **Nähe** der Packungspartikel.
- ➔ berücksichtigt: **Diffusion der Moleküle !**
beschreibt im **H/u-Diagramm** eine **Hyperbel** und ist in der **LC** zu **vernachlässigen**.

III.11 Die **van Deemter-Gleichung**

Stoffaustausch
-Anteil
C-Term

➔ berücksichtigt: **Kinetische Beiträge!**
Geschwindigkeit des Stoffaustausches
zwischen stationärer und mobiler Phase.

➔ **Geschwindigkeit des Massentransportes** der
Probenmoleküle **in die Poren** der stat. Phase
und **aus ihnen heraus** .

III.11 Die **van Deemter-Gleichung**

Die **H/u-Kurve** erhält man nach Addition aller drei Terme der **van-Deemter-Gleichung**:

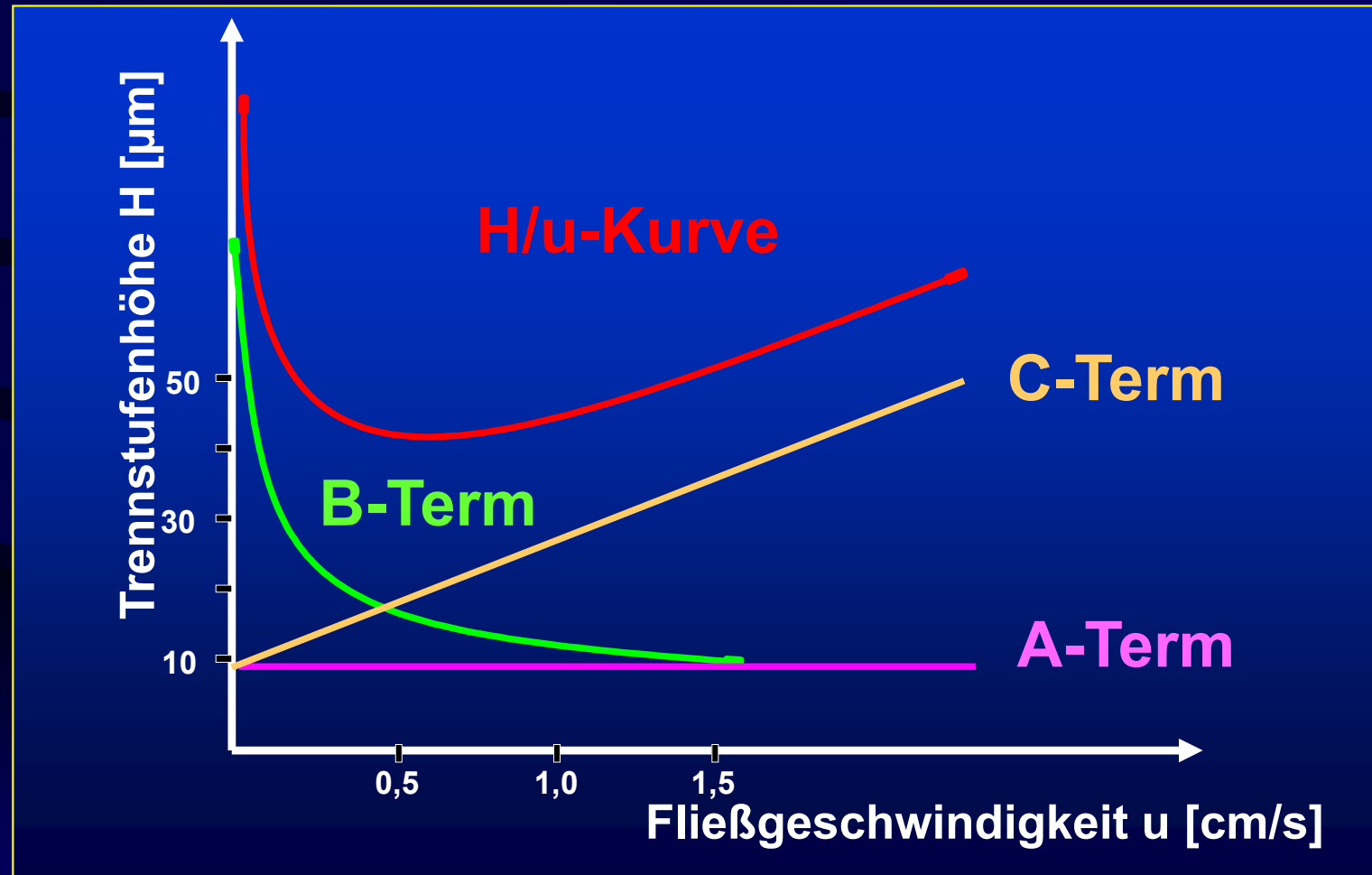


Abb. 8: H/u-Diagramm mit den Termen der Van-Deemter-Gleichung

III.12 Facit der **van Deemter Gleichung**

In der Chromatographie ist man bestrebt, **gute Trennungen** in **relativ kurzen Analysenzeiten** durchzuführen. D.h. man versucht eine **minimale Trennstufenhöhe** bei möglichst flacher **H/u Kurve** zu erzielen.

Dies läßt sich erreichen durch:

- ➔ **Geringe Korngrößen**
(Einfluß auf **A-Term** und **C-Term**)
- ➔ **Enge Korngrößenverteilung** bzw. dichte Packung
(Einfluß auf **B-Term**)
- ➔ **Geringer Säulendurchmesser**
(Einfluß auf **A-Term** und **B-Term**)



Chromatographie I
WS 2022/23 R. Vasold



Kapitel IV: Das Chromatogramm

IV.1 Qualitative Aussagen



z.B. Zuordnung von Substanzen über **identische Retentionszeit $t_R(x)$** .



Ggf. Injektion von **Referenzsubstanzen**.



z.B. Identifizierung von Substanzen über **UV-APEX-Spektren** (Diodenarray),
siehe Seminar und Praktikum.



z.B. Identifizierung von Substanzen über **Isoplot und 3-D-Plot** .

IV.2 **Quantitative** Aussagen

- ➔ Die **Fläche** eines **Peaks** ist der **eingespritzten Stoffmenge** proportional
- ➔ Dadurch hat **jede** Substanz für **jede** Chromatographiebedingung ihren eigenen **Proportionalitätsfaktor**.
- ➔ Diese Proportionalitätsfaktoren können durch Injektion von **Kalibriergemischen**, die die zu bestimmenden Substanzen in **bekannter Konzentration** enthalten, ermittelt werden (Methode des **Internen Standards** - siehe Seminar und Praktikum)

IV.3 Kenngrößen des Chromatogramms

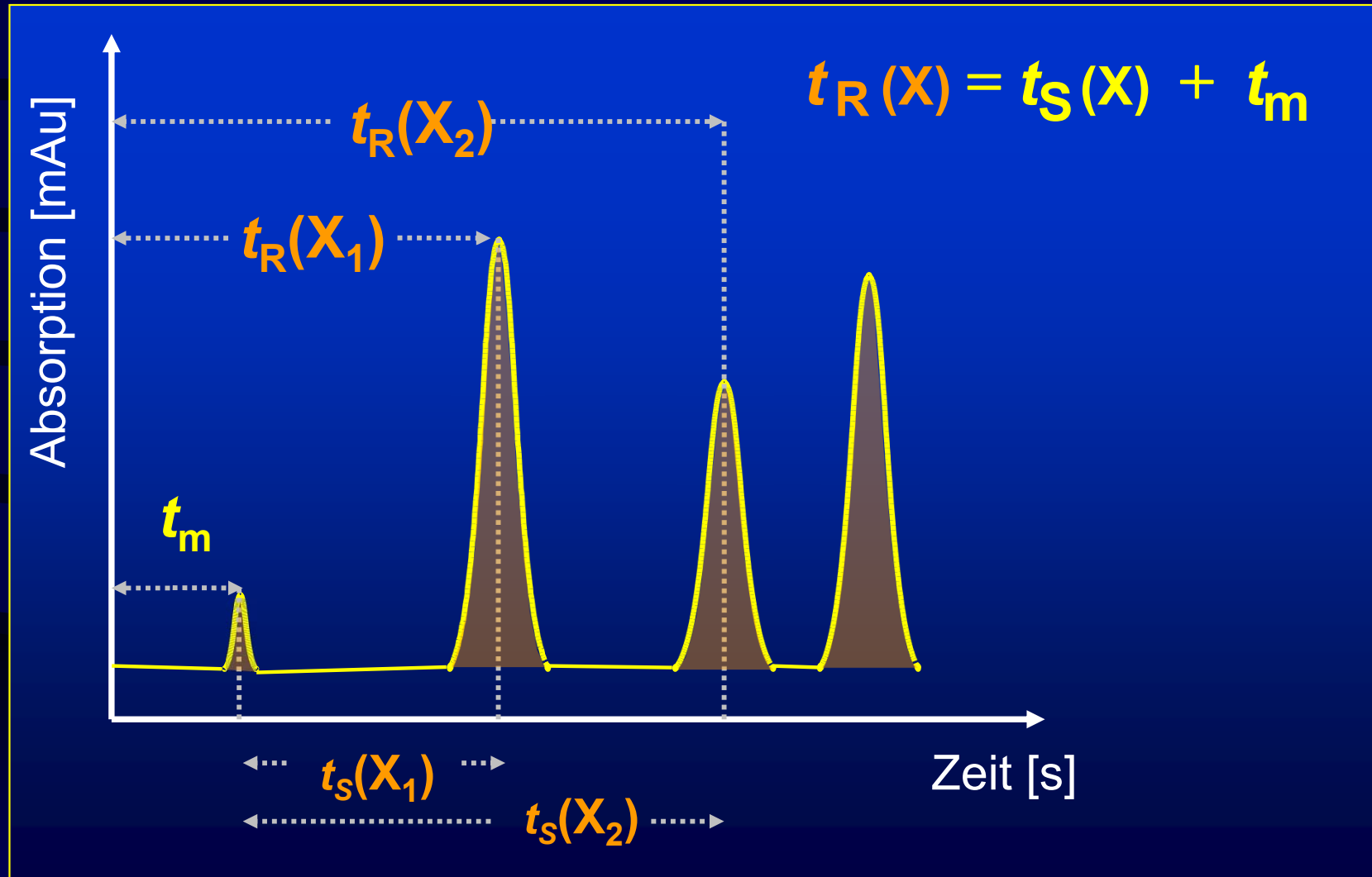


Abb. 9: Musterchromatogramm mit $t_s(X)$ als Aufenthaltszeit der Komponente X in der stationären Phase

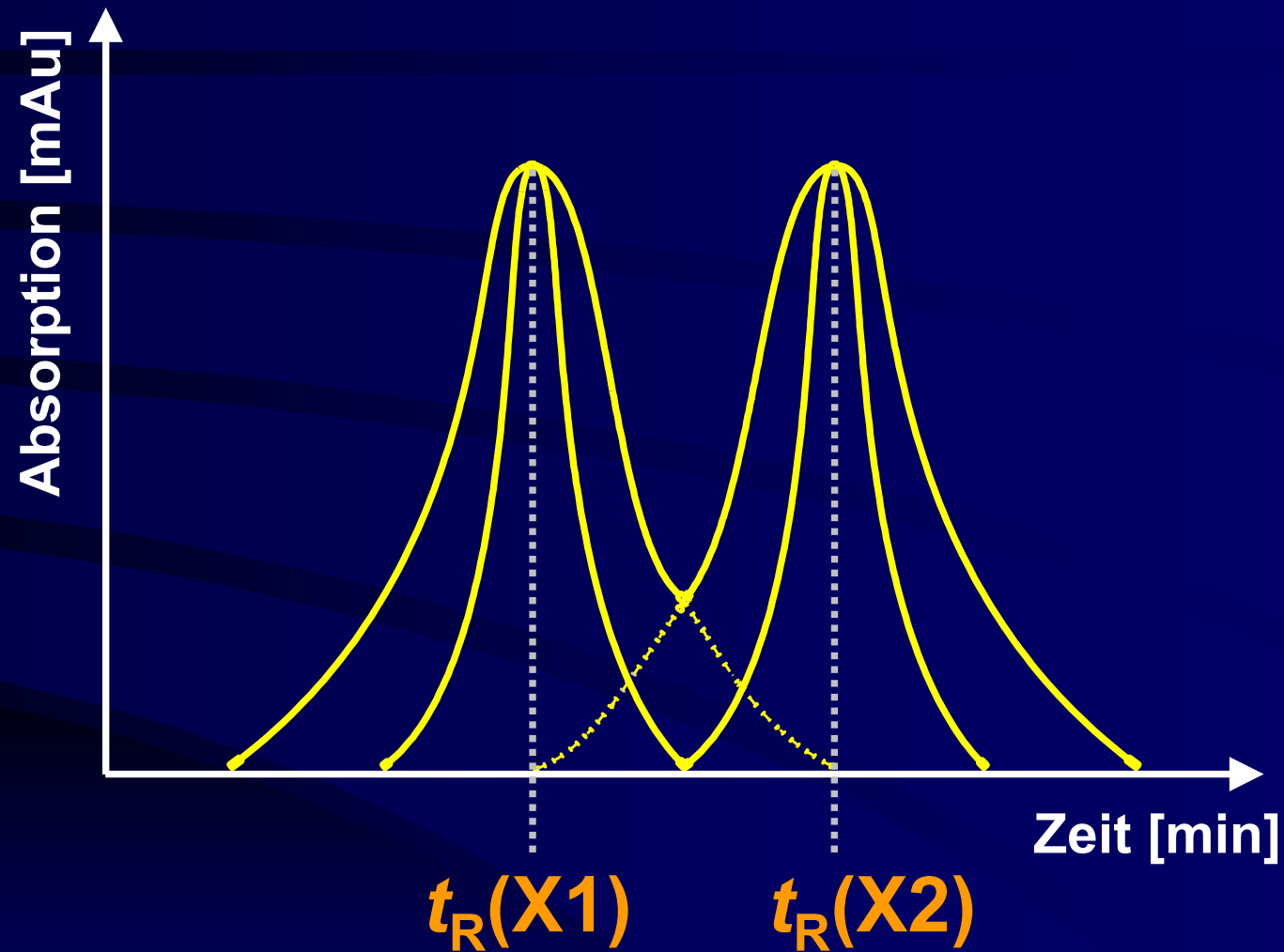
IV.5 Das Problem **schlecht getrennter Peaks**

Abb. 10: Chromatogramm mit schlecht aufgelöstem Peakpaar

IV Das Chromatogramm

IV.6 Die Selektivität (Trennfaktor) α

beschreibt die **Güte** der Trennung zweier **benachbarter Peaks**

Wird gebildet aus dem **Quotienten** der beiden **Retentionsfaktoren** k_2 und k_1

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_s(X_2)}{t_s(X_1)} \quad \text{mit } k_2 \geq k_1 \quad (17)$$

$$\alpha = 1$$



Keine Trennung

$$1 < \alpha < 5$$



optimale Trennung

IV.7 Die **Auflösung** R_S

Die **geometrische** Definition lautet:

$$R_S = \frac{(t_R(X_2) - t_R(X_1))}{0,5 (t_w(X_1) + t_w(X_2))} \quad (18)$$

**Basisbreite vom Peak
der Komponente X1**

**Basisbreite vom Peak
der Komponente X2**

IV.8 Das Gaußprofil

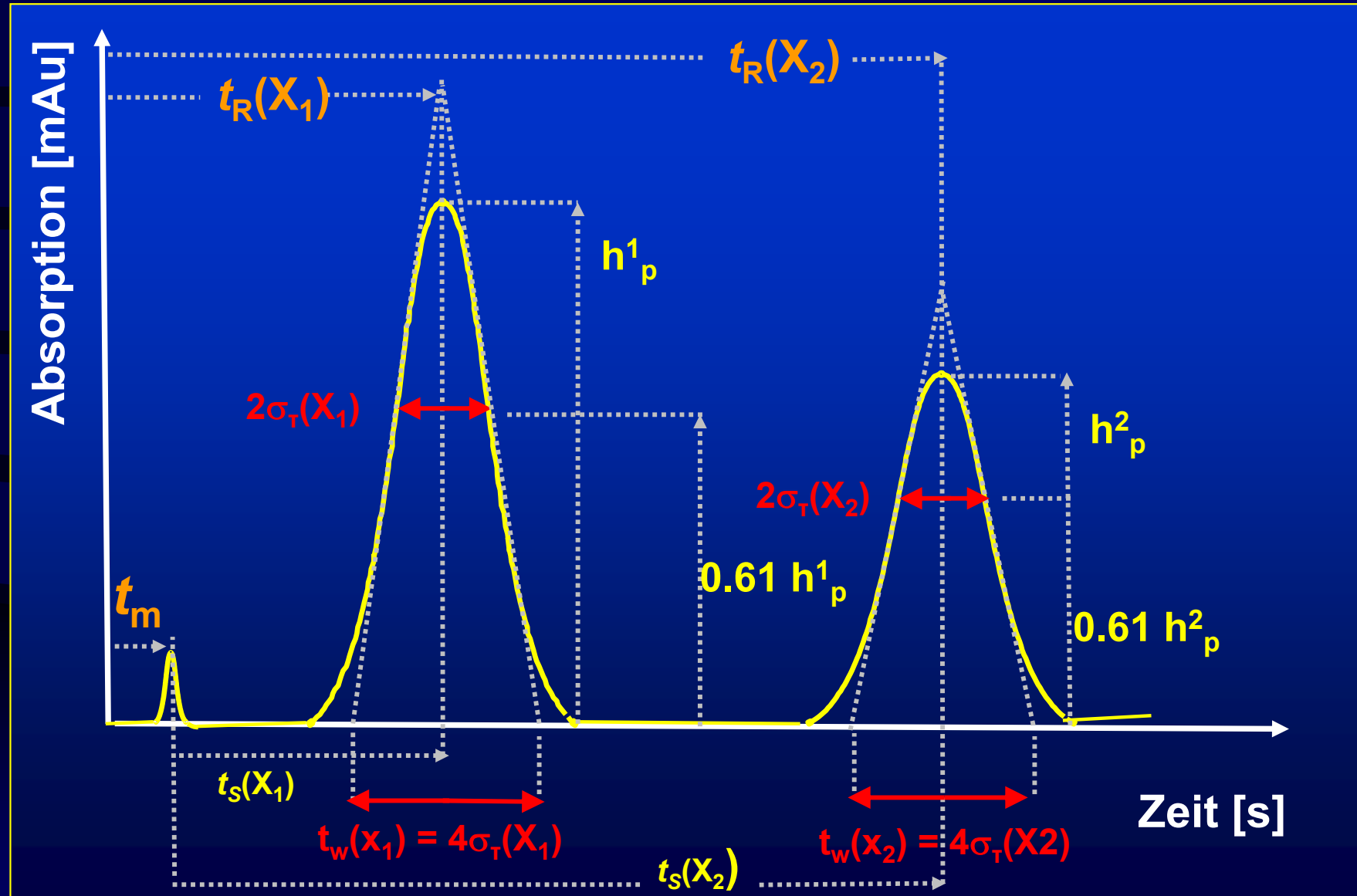


Abb. 11: Musterchromatogramm mit t_w als Basisbreite und $\sigma_T(X)$ als Diffuse Bandenverbreiterung

IV.9 Bewertung der **Auflösung** R_S

$$R_S = 1$$

Peaks liegen um ihre mittlere Basisbreite auseinander d.h. Überlappung 3%

$$1 < R_S < 1.5$$

fast vollständige (meist ausreichende) Trennung

$$1.25 < R_S < 1.5$$

vollständige, gute Trennung

$$R_S > 1.5$$

meist unnötig gute Trennung d.h. zu lange Retentionszeit



Chromatographie I
WS 2022/23 R. Vasold



Kapitel V: Literatur

Snyder L.R., Kirkland J.J.,
Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley.

Meyer V.R.,
Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie,
Salle+Sauerländer.

Unger K.K.,
Handbuch der HPLC, GIT Verlag.

Scott R.P.W.,
Chromatographic Detectors, Jack Cazes, Cherry Hill,
New Jersey

Huber L., George, S.A.,
Diode Array Detection in HPLC, Jack Cazes, Cherry Hill,
New Jersey